Istituto d'Igiene della R. Università di Cagliari

Sull'azione patogena dei blastomiceti

MEMORIA SECONDA

DEL

Prof. FRANCESCO SANFELICE

ESTRATTO DAGLI *ANNALI D'IGIENE SPERIMENTALE*
Volume VI, fascicolo II.

ROMA
Società Editrice Dante Alighieri
Via delle Convertite, N. 8

1896

Istituto d'Igiene della R. Università di Cagliari

SULL'AZIONE PATOGENA DEI BLASTOMICETI

MEMORIA SECONDA

DEL

Prof. FRANCESCO SANFELICE

I.

Tutti gli autori, che recentemente si sono occupati dei blastomiceti patogeni, si possono distinguere in due gruppi: in quelli, cioè, che hanno avuto la opportunità d'isolare dall'uomo, da un animale o dall'ambiente, un blastomicete e ne hanno studiato le proprietà culturali e patogene, ed in quelli che si sono contentati di ricercare se nei tumori maligni dell'uomo si trovavano delle forme parassitarie simili per la maniera di colorirsi e per la struttura ai blastomiceti patogeni già descritti.

Al Busse [1] senza dubbio spetta il merito di avere per il primo isolato dall'uomo un blastomicete patogeno. Egli, nello studiare un sarcoma molle della tibia di una donna, accanto a molte cellule giganti vide dei corpicciuoli splendenti, rotondi od ovali, la cui grandezza oscillava tra quella di un nucleo di una piccola cellula e quella di una cellula epatica, liberi o nello interno delle cellule giganti. Questi corpicciuoli, considerati prima dal Grawitz come coccidi e riconosciuti poi dal Löffler, in seguito a coltura, come blastomiceti di una specie patogena, furono dall'autore inoculati ad un cane e a due conigli. Da questi esperimenti d'inoculazione il Busse non trae altra conclusione che questa, di essere cioè riuscito a far vivere e moltiplicare in tre animali le inclusioni cellulari osservate nell'uomo. Nulla egli dice intorno ai processi patologici determinati nel

[1] Busse, *Ueber parassitäre Zelleneinschlüsse und ihre Züchtung*. Centralblatt für Bakt., vol. XVI, pag. 175, 1894.

cane e nei due conigli con il materiale infettante preso dall'uomo, nè riferisce inoculazioni fatte su vasta scala negli animali con le colture pure del blastomicete patogeno. Sicchè da questo primo lavoro del Busse risulta che inclusioni cellulari, le quali sembrarono al Grawitz appartenere al gruppo dei microsporidi, dei corpuscoli di Cornalia o delle forme descritte come coccidi, ed all'autore sembrarono simili a quelle descritte ad esempio da Wickham e Darier nel morbo di Paget, si possono: 1° trasportare e far moltiplicare da animale ad animale; 2° coltivare su diversi substrati nutritivi; 3° inoculare negli animali dalle colture pure. Nessun rapporto etiologico quindi è stabilito dal Busse fra il sarcoma molle della tibia ed il blastomicete patogeno trovato.

In una memoria successiva,[1] pubblicata circa otto mesi dopo il lavoro innanzi citato, il Busse descrive come *Saccharomycosis hominis* la infezione della donna, che in vita era stata operata non più per sarcoma molle, come l'autore aveva affermato nel primo lavoro, ma per flogosi sottoperiostea cronica della tibia. Questa infezione, decorrente sotto la forma di una pioemia cronica, con distruzione purulenta della cute, della cornea, delle ossa, dei pulmoni, dei reni e della milza, era stata prodotta da un blastomicete patogeno, che si trovava o nell'interno delle cellule, sotto forma d'inclusione cellulare, ovvero al di fuori delle cellule, talvolta nudo, talvolta rivestito di una membrana omogenea, con uno o più granuli splendenti nello interno, facilmente coltivabile nei diversi terreni di nutrizione solidi e liquidi, capace di moltiplicarsi negli animali da esperimento, producendo una infiammazione locale, che dava suppurazione e poi a poco a poco guariva.

Dopo aver letto attentamente questo secondo lavoro del Busse, si ha la certezza che l'autore ha osservato bene, ma ha interpretato male. Ed infatti come si fa ad ammettere che l'infezione fosse una forma di pioemia cronica, quando l'autore stesso ci dice nella storia che per lo più ha decorso senza febbre? Ed inoltre si può parlare di ascessi metastatici, quando nella milza, nei reni e nel pulmone vi erano dei noduli abbastanza consistenti e quella sostanza cremosa, puriforme, battezzata per pus dall'autore, conteneva numerose cellule giganti? A me sembrerebbe più logico pensare che il Busse si sia trovato innanzi ad un caso di sarcoma molle della tibia con consecutiva generalizzazione del processo e morte dell'individuo, anzi che innanzi ad un caso di pioemia cronica.

[1] Busse, *Ueber Saccharomycosis hominis.* Virchow's Archiv, vol. CXL, pag. 23, 1895.

Da quanto ho innanzi esposto intorno ai lavori del Busse, appare chiaro che egli non ha minimamente accennato al fatto che i blastomiceti possano essere la causa dei tumori maligni dell'uomo. Dallo aver trovato un blastomicete, che nell'uomo produce una forma di pioemia cronica e dallo avere osservato che questo parassita, tanto nell'uomo, quanto negli animali da esperimento, si presenta simile alle inclusioni cellulari, descritte dagli autori, al dimostrare che vi sono dei blastomiceti patogeni, che non solamente si colorano in modo identico, ma sono morfologicamente simili a quelle forme descritte come coccidi nei tumori maligni dell'uomo e che sono capaci di produrre neoformazioni cellulari negli animali suscettibili a contrarre tumori maligni per decorso e per struttura simili a quelli dell'uomo, vi è per lo meno un abisso.

Dopo avere studiato per un anno intero la morfologia e la biologia dei blastomiceti, che si sviluppano nei succhi di alcuni frutti,[1] in diversi lavori[2] pubblicati in quest'anno ho studiata l'azione patogena di un blastomicete, cui ho dato il nome di *Saccharomyces neoformans*. Dopo aver trovato dei metodi specifici di colorazione per questo saccaromicete, mi sono potuto facilmente convincere della completa identità morfologica, che presentava nei tessuti degli animali inoculati con colture pure, con quelle forme descritte come coccidi nei tumori maligni dell'uomo. E si noti che venni in questa convinzione dopo aver fatte molte centinaia di sezioni di tumori maligni dell'uomo e degli animali e dopo avere colorate queste con gli stessi metodi specifici, che usavo per le sezioni degli organi delle cavie. In questo modo ho potuto bene stabilire la identità morfologica tra blastomiceti e corpuscoli a fucsina del Russell, tra blastomiceti e molte delle forme descritte dagli autori come coccidi. Oltre a ciò ho dimostrato che mentre il *Saccharomyces neoformans* inoculato nelle cavie dà luogo ad un'infezione diffusa, producendo tumori nelle glandole linfatiche, nell'epiploon, nella milza, nel rene, nel pulmone, nel cervello, i quali sono costituiti più dall'enorme accumulo delle forme parassitarie anzi che dagli elementi del tessuto, nei cani e nei polli

[1] Sanfelice, *Contributo alla morfologia e biologia dei blastomiceti.* Annali dell'Istituto d'Igiene della R. Università di Roma, vol. IV, pag. 463, 1894.

[2] Sanfelice, *Ueber eine für Thiere pathogene Sprosspilzart und über die morphologische Uebereinstimmung, welche sie bei ihrem Vorkommen in den Geweben mit den vermeintlichen Krebscoccidien zeigt.* Centralblatt f. Bakt., vol. XVII, pag. 113, 1895. — *Sull'azione patogena dei blastomiceti come contributo alla etiologia dei tumori maligni.* Il Policlinico, vol. II, 1895. — *Sull'azione patogena dei blastomiceti.* Memoria prima. Annali d'Igiene, vol. V, pag. 239, 1895.

si hanno tumori locali e riproduzioni metastatiche, per struttura molto simili a quelle dell'uomo. Quindi non è punto da paragonare l'azione patogena che il *Saccharomyces neoformans* esercita nelle cavie con quella che si osserva in altri animali, suscettibili a contrarre tumori maligni. La cavia è un animale suscettibilissimo all'infezione blastomicetica e quindi in essa osserviamo grande diffusione del parassita, morte dopo un tempo relativamente breve e scarsa reazione da parte dei tessuti. Negli altri animali meno suscettibili all'infezione blastomicetica osserviamo processi infettivi locali, nei quali i parassiti sono scarsissimi e la reazione da parte degli elementi fissi del tessuto è considerevolissima.

Un mese dopo la pubblicazione del mio primo lavoro, il Maffucci ed il Sirleo [1] pubblicarono una nota, nella quale dimostrarono: 1° che esiste un blastomicete patogeno con carattere di determinare fatti di neoproduzione d'indole cronica, i cui prodotti cellulari sono capaci di emigrare dal punto della neoformazione alle glandole linfatiche e che il parassita vive fuori e dentro gli elementi cellulari e che emigra isolatamente o con gli elementi della neoproduzione; 2° che esso parassita può distruggere le cellule in cui si annida come può essere da queste alla sua volta distrutto, fino a trovare un prodotto patologico generato dallo stesso, senza la sua presenza.

Poco tempo dopo la pubblicazione della mia seconda nota, i due suddetti autori hanno pubblicato un altro lavoro, [2] nel quale dànno conto dei risultati delle inoculazioni con colture pure del blastomicete isolato, nei cani, nei conigli, nelle cavie e nei polli, ed affermano che considerando le forme patologiche ottenute in questi animali, quantunque abbiano la tendenza alla fase regressiva e non progressiva, hanno tutto il carattere di neoformazione e non di processi puramente infiammatorî e si distaccano dal comune tessuto di granulazione, quantunque vi sieno cellule giganti, le quali si trovano nei sarcomi e nei cancri.

Ora, da tutto quanto affermano gli autori nei due loro lavori, appare chiaro che essi non ancora si sono formati un'idea esatta dell'azione patogena, che il blastomicete da loro isolato esercita negli animali da esperimento. Ed incerti sono anche gli autori nella descrizione di alcune proprietà morfologiche del parassita. Infatti, mentre

[1] Maffucci e Sirleo, *Contributo ed esperimenti intorno ad un blastomicete patogeno con inclusione dello stesso nelle cellule dei tessuti patologici.* Il Policlinico, anno II, pag. 138, 1895.

[2] Maffucci e Sirleo, *Nuovo contributo alla patologia di un blastomicete.* Il Policlinico, anno II, pag. 245, 1895.

nella prima nota, descrivendo il blastomicete, parlano di nucleo e della parte che prende nella moltiplicazione, nella seconda nota dicono di aver mandato le culture del parassita al prof. Cuboni per decidere la quistione, se esista oppur no il nucleo. In tale errore non sarebbero caduti il Maffucci ed il Sirleo, se invece di giudicare della morfologia del parassita sulle forme prese dall'animale, fossero partiti dall'esame dei blastomiceti sviluppati nei comuni terreni di nutrizione. Si sarebbero allora subito convinti dell'impossibilità di dare significato di corpo cellulare alla parte ialina di cui i blastomiceti si circondano nell'organismo e di nucleo alla parte cromatica centrale.

Non sono mancate in questi ultimi tempi delle conferme molto importanti a ciò che io avevo con insistenza affermato nei miei lavori, che cioè i blastomiceti sono la causa dei tumori maligni dell'uomo. Nella seconda mia nota avevo scritto che, per dimostrare che i blastomiceti sono la causa dei tumori maligni dell'uomo, potevano seguirsi due vie: o cercar d'isolare in coltura pura un blastomicete da un tumore maligno dell'uomo ed inocularlo negli animali soggetti a contrarre tumori, identici per struttura a quelli dell'uomo; ovvero produrre negli stessi animali, in seguito ad inoculazione di colture pure di blastomiceti, dei tumori per struttura e per decorso analoghi a quelli dell'uomo. Scelsi la seconda via, perchè ordinariamente le forme parassitarie nei tumori maligni dell'uomo sono molto scarse e, dovendo sottoporre il tumore ad un minuto frazionamento per snidarle, è impossibile escludere il sospetto che le forme di blastomiceti esistenti nell'aria cadano sul tumore e traggano in inganno l'osservatore. Anche io ho isolato da diversi tumori maligni dell'uomo blastomiceti che, inoculati in alcuni animali, si sono dimostrati patogeni, ma la scarsezza delle colonie non toglieva il dubbio che fossero dovute a blastomiceti caduti dall'aria. Scrissi inoltre che con ciò non andava escluso che qualche volta poteva capitare di asportare un tumore maligno, nel quale le forme parassitarie erano così numerose da poter facilmente riuscire positiva la coltura, senza aver bisogno di ricorrere al frazionamento del tumore. Ciò sarebbe certamente capitato al Roncali, se egli avesse avuto la fortuna di avere il tumore da lui studiato, appena asportato. La fortuna sfuggita al Roncali è capitata ad altri, avverandosi così ciò che io aveva predetto.

Infatti nella seduta del 15 marzo di questo anno il Kahane [1] ha presentato alla Società imperiale di medicina di Vienna colture di

[1] Kahane, *Présence d'une levure dans les cancers*. La Semaine médicale, 20 marzo 1895.

un blastomicete ottenute da un cancro dell'utero. Questo blastomicete, una specie di *Saccharomyces*, è stato trovato più volte dall'autore in tumori cancerosi e sarcomatosi. Inoltre il Curtis [1] nell'esaminare al microscopio un tumore di aspetto mixomatoso della regione superiore della coscia destra di un giovane trovò un gran numero di corpuscoli rotondi, muniti di una spessa membrana ialina, con contenuto granuloso, che per la loro struttura e per il modo di riprodursi per gemmazione furono riconosciuti per blastomiceti. L'autore quindi si è trovato in presenza di un caso di tumore sottocutaneo prodotto nell'uomo da un blastomicete patogeno. Questo parassita non solo è stato coltivato dall'autore in coltura pura, ma inoculato sotto la cute del dorso di un coniglio ha dato risultato positivo, in quanto che dopo dodici giorni si è sviluppato un tumore della grandezza di un piccolo arancio. L'autore, riservandosi di riferire le ricerche istologiche nel lavoro completo, conchiude che esistono dei blastomiceti patogeni per l'uomo, i quali danno origine nel tessuto connettivo sottocutaneo a tumore di aspetto mucoso e confusi finora con semplici mixomi.

Anche il Corselli e Frisco [2] in un caso di sarcoma delle glandole mesenteriali dell'uomo hanno isolato in coltura pura un blastomicete, che inoculato negli animali si è dimostrato patogeno. Peccato che lo scarso numero d'inoculazioni e la ricerca istologica fatta in modo molto superficiale non corrisponda alla importanza del caso avuto in esame.

E con questo ultimo lavoro si chiude la serie di tutti quegli osservatori, i quali o hanno trovato un blastomicete che inoculato negli animali si è dimostrato patogeno, ovvero hanno avuto la fortuna d'isolare blastomiceti in coltura pura da tumori maligni dell'uomo.

Nel campo puramente istologico quelli che hanno fatto migliori ricerche per constatare la presenza dei blastomiceti nei tumori maligni dell'uomo sono il Roncali [3] e l'Aievoli. [4]

[1] Curtis, *Sur un parasite végétale de l'espèce des levures produisant chez l'homme des tumeurs d'aspect myxomateux.* La Presse médicale, 28 settembre 1895.

[2] Corselli e Frisco, *Pathogene Blastomyceten beim Menschen. Beiträge zur Aetiologie der bösartigen Geschwülste.* Centralblatt für Bakteriologie, vol. XVIII, pag 368, 15 ottobre 1895.

[3] Roncali, *Sopra particolari parassiti rinvenuti in un adeno-carcinoma della ghiandola ovarica.* Il Policlinico, vol. II, 1895. — *I blastomiceti negli adeno-carcinomi dell'ovario.* Bollettino della regia Accademia medica di Roma, anno XXI, 1895. — *I blastomiceti nei sarcomi.* Il Policlinico, vol. II, 1895.

[4] Aievoli, *Osservazioni preliminari sulla presenza di blastomiceti nei neoplasmi.* Il Policlinico, anno II, 1895.

Il Roncali in una serie di lavori fatti molto accuratamente, adoperando i metodi di colorazione specifica pei blastomiceti da me comunicatigli, ha potuto trovare in alcuni adeno-carcinomi dell'ovaio ed in alcuni sarcomi numerose forme parassitarie, le quali per il modo di colorirsi e per la struttura non lasciano alcun dubbio sulla loro vera natura.

Anche l'Aievoli ha riscontrato numerose forme parassitarie in un carcinoma della mammella e le ha molto bene descritte e figurate.

E con ciò credo di aver passato brevemente in rassegna tutti i lavori pubblicati recentemente intorno alla teoria parassitaria dei tumori maligni fondata sull'azione patogena dei blastomiceti.

Dei lavori di quei pochi autori, i quali hanno ancora il coraggio di sostenere che le forme parassitarie, le quali si credevano prima coccidi ed ora sono ritenute blastomiceti, appartengono a degenerazioni cellulari o si trovano accidentalmente nei tumori, non credo valga la pena far menzione, non avendo in essi altro da considerare che il gran tempo perduto in ricerche inutili e inconcludenti.

Un lavoro del Banti [1] sui parassiti della malattia mammaria del Paget merita di essere citato a parte perchè pubblicato prima che si conoscesse l'azione patogena dei blastomiceti. L'autore nelle cellule cancerose ha trovato inclusi in quantità grandissima alcuni tra i corpi descritti dal Soudakewitch, Foà, Ruffer e Walker, ecc. Importante è l'affermazione del Banti, che cioè lo studio fatto per lungo tempo sulle inclusioni non parassitiche delle cellule cancerose lo autorizza ad ammettere che i corpi inclusi da lui studiati non presentano analogia di sorta con le inclusioni predette, benchè tra queste ve ne sieno alcune le quali hanno coi parassiti molta somiglianza, sia per la forma, sia per l'affinità elettiva verso l'ematossilina. L'autore inoltre molto giustamente rassomiglia la maniera di moltiplicarsi per gemmazione dei corpi inclusi alla divisione delle cellule del *Saccharomyces*. A nessuno sfuggirà la importanza di questa osservazione prima che si conoscesse l'azione patogena dei blastomiceti. Quanto al significato etiologico di queste forme parassitarie, l'autore ritiene che rappresentino una invasione secondaria e non abbiano importanza patogenica, ciò che si spiega facilmente date le scarse e confuse conoscenze, che si avevano sulla vera natura delle forme incluse.

In questa seconda memoria mi occuperò di un nuovo blastomicete patogeno, che non è tanto importante per la provenienza e per le

[1] Banti, *I parassiti della malattia mammaria del Paget*. Nota preliminare. Lo Sperimentale, anno XLVIII, 1894.

lesioni anatomo-patologiche che produce negli animali da esperimento, quanto per la maniera come degenera nei tessuti, presentando delle masse calcaree.

II.

Verso la fine del passato maggio mi furono mandate dal dottor Loi, direttore del civico mattatoio di Cagliari, alcune glandole linfatiche di un bue morto in seguito a carcinoma primitivo del fegato e diffusione del processo patologico a tutto il sistema linfatico.

Alcuni pezzi di queste glandole molto ingrossate furono utilizzati per la ricerca microscopica allo stato fresco, per la inoculazione negli animali da esperimento e per fare le colture nei diversi terreni di nutrizione solidi e liquidi; altri pezzi poi furono conservati parte in alcool assoluto e parte in liquido di Müller per le ricerche istologiche.

Dissociando il tessuto fresco con gli aghi in un miscuglio a parti uguali di glicerina ed acqua in diversi preparati notai la presenza di blastomiceti, più o meno rotondi, di diversa forma e grandezza. Essi erano circondati da una membrana rifrangente, che negli elementi più grossi era alquanto più spessa che in quelli più piccoli e contenevano nell'interno dei granuli molto rifrangenti, di diverso numero e grandezza. Rare erano quelle forme parassitarie che, allo esterno della membrana, molto rifrangente la luce, facevano vedere un alone o seconda membrana ialina.

Accanto a queste forme parassitarie, che facevano vedere la struttura solita che i blastomiceti presentano nei tessuti, ve ne erano molte altre alquanto diverse e che a stento anche un occhio esercitato avrebbe giudicato appartenere ai medesimi parassiti. Questi corpi avevano presso a poco la medesima grandezza dei parassiti, ma erano o del tutto omogenei e rifrangenti la luce come il vetro, ovvero come quelle masse calcaree che spesso si riscontrano nei tessuti patologici, o mostravano il centro occupato da un grosso granulo rifrangente circondato da un piccolo spazio chiaro, e questo a sua volta circondato da un alone della stessa rifrangenza della parte centrale (fig. 1, Tav. I).

Oltre le forme innanzi descritte si vedevano anche, in numero abbastanza grande, delle masse irregolarmente conformate, spesso angolose, della medesima rifrangenza, e che furono da me considerate da principio come veri prodotti di degenerazione calcarea, così frequenti nei tumori, specialmente degli erbivori. Tra queste masse calcaree

inoltre si osservava un *detritus* proveniente dalla loro rottura in particelle più o meno piccole.

Le sezioni di queste glandole linfatiche (fig. 1, Tav. I), colorate seguendo i metodi esposti nella precedente memoria, facevano vedere la riproduzione del processo neoplastico primitivo e qua e là gruppi o masse di blastomiceti degenerati e scarse forme normali ben colorate.

Le colture piatte fatte stemperando un po' del tessuto fresco nel terreno di nutrizione fecero vedere dopo 24 a 48 ore che erano state tenute nel termostato a 37° C. numerose colonie di un blastomicete, che isolato ed inoculato a cavie, piccoli topi bianchi, pecore, cani, buoi, asini, polli, si è mostrato patogeno, e nei tessuti di quasi tutti questi animali, degenerando, ha presentato le stesse masse calcaree che innanzi ho descritto, e che dimostrano la importanza etiologica del parassita nella genesi del neoplasma. Per questa ragione ho creduto bene di denominare *Saccharomyces lithogenes* questo blastomicete.

In questa prima parte del lavoro descriverò le proprietà morfologiche e biologiche del parassita, dicendo solo dell'azione patogena che esercita nelle cavie, nei topi bianchi ed in parte nelle pecore, riservandomi di esporre in altro lavoro i risultati osservati negli altri animali.

Il *Saccharomyces lithogenes* si sviluppa bene tanto nei comuni terreni di nutrizione (agar, gelatina) di reazione neutra o leggermente alcalina, quanto in quelli di reazione acida per la presenza di acido tartarico.

Sulle piastre di gelatina, tenute alla temperatura dell'ambiente (15-20° C.) dopo alcuni giorni si osservano colonie superficiali più grandi e colonie profonde più piccole. Mentre le prime sono rotonde, della grandezza di una testa di spillo, bianche, sollevate a cupola sulla superficie del terreno di nutrizione, le seconde sono molto più piccole, a margini netti, di colorito tendente leggermente al giallo-chiaro. Osservando con piccolo ingrandimento queste colonie, si distinguono molto bene, specialmente nelle colonie superficiali, le cellule blastomicetiche rotonde, giustaposte le une alle altre.

Nelle colture piatte in agar la forma delle colonie è perfettamente identica a quella innanzi descritta.

La coltura per infissione in gelatina presenta sviluppo abbastanza rigoglioso in superficie e lungo lo innesto. In superficie ha luogo la formazione di una patina bianca, di aspetto umido, con bordi netti: lungo lo innesto si forma una striscia biancastra fatta di tante colonie strettamente ravvicinate le une alle altre. La gelatina non viene ram-

mollita. Simile è l'aspetto che presenta la coltura per infissione in agar. Sviluppo ugualmente rigoglioso si osserva tanto nei substrati nutritivi cui si è aggiunto l' 1 $^0/_0$ di zucchero di uva, quanto in quelli che ne sono privi.

Sulla superficie dell'agar solidificata obliquamente nei tubi si osserva da principio la formazione di una pellicola bianca, omogenea, con bordi netti, che man mano che la coltura va invecchiandosi cambia aspetto. La parte centrale va ripiegandosi ed acquista un colore tendente leggermente al giallo, mentre la parte periferica conserva l'aspetto che aveva prima.

Molto caratteristica è la coltura su patata. Nei primi giorni dopo lo innesto si forma una pellicola sottile, appena distinguibile, che nei giorni successivi va ispessendosi, sollevandosi sulla superficie del terreno di nutrizione ed acquistando un colorito bruno intenso. La patina ha aspetto secco, i suoi bordi sono netti, la sua superficie mammellonata.

Costantemente ho notato che se le colture su patate si tengono nel termostato a 37° C. non si ha quella produzione di colore bruno così intenso, che si osserva nelle colture sviluppatesi all'ambiente in presenza della luce diffusa.

Anche nei diversi terreni di nutrizione liquidi addizionati di zucchero di uva o di acido tartarico si ha sviluppo rigoglioso. La massa principale della coltura si deposita al fondo del recipiente, e qualche volta alla superficie si osserva la formazione del così detto velo, che specialmente nei liquidi contenenti zucchero trattiene le bollicine di gas.

Dalla enumerazione dei caratteri culturali del *Saccharomyces lithogenes* appare chiaro che esso appartiene al 1° gruppo dei blastomiceti da me stabilito, ed inoltre si differenzia pochissimo dal *Saccharomyces neoformans*. La differenza più importante, come vedremo meglio in seguito, non sta tanto nel modo di svilupparsi nelle colture, quanto nella maniera con cui degenera nell'organismo. È appunto per questa ultima proprietà che bisogna farne una specie a sè.

Osservando le cellule blastomicetiche prese da una coltura fatta su di uno dei terreni di nutrizione innanzi menzionati in goccia pendente di acqua si vedranno elementi in massima parte rotondi, piccoli e grandi, i primi con membrana appena distinguibile e contenuto del tutto omogeneo, i secondi con membrana abbastanza evidente e con contenuto protoplasmatico costituito da due sostanze, l'una rifrangente, l'altra ialina. La sostanza rifrangente o è addossata alla membrana in forma di cercine o semiluna, ovvero ha la forma di un grosso granulo centrale o di minuti granuli per lo più riuniti nel centro.

Nelle colture non si vedono mai forme che accennino a quel processo di degenerazione calcarea di cui diremo in seguito, parlando del modo come il *Saccharomyces lithogenes* presentasi nei tessuti. La unica membrana che i blastomiceti presentano nelle colture è ben diversa per spessezza e rifrangenza da quella che presentano nell'organismo. Inoltre nelle colture i blastomiceti non presentano mai doppia membrana, come accade spesso nell'organismo. Quindi anche per il *Saccharomyces lithogenes* come per il *Saccharomyces neoformans* il modo di presentarsi nelle colture è affatto diverso da quello con cui si presentano nell' organismo.

Seguendo la moltiplicazione del *Saccharomyces lithogenes* sotto al campo del microscopio si vede che dopo un certo tempo da ciascuna cellula fa prominenza da un punto della superficie una piccola gemma, che va sempre ingrandendosi, e poi da un altro punto se ne forma un'altra. In questo modo si formano le piccole colonie. I granuli o il granulo rifrangente non prende mai parte alla gemmazione.

Come ho già detto innanzi, le piccole gemme, le quali nei liquidi si distaccano subito dalla cellula madre, hanno da principio contenuto omogeneo, il quale in seguito, con lo ingrandire dell'elemento, si differenzia nelle due sostanze, l'una rifrangente, l'altra ialina.

Il *Saccharomyces lithogenes* trattato con soluzioni deboli o forti di acidi non si altera nella sua struttura, come non si altera se si tratta con forti soluzioni di alcali, come soda, potassa, anche a caldo.

Le cellule di questo saccaromicete si colorano intensamente con la maggior parte delle soluzioni idroalcooliche dei colori di anilina. Mentre le cellule giovani a contenuto protoplasmatico omogeneo si colorano intensamente senza presentare nel loro interno alcuna struttura, nelle cellule più grandi, nelle quali è avvenuta una differenziazione del contenuto protoplasmatico, si vede la sostanza rifrangente più fortemente colorata, e la sostanza ialina debolmente colorata.

Per le ragioni esposte in altro lavoro non si può dare assolutamente il valore di spore ai granuli rifrangenti delle cellule blastomicetiche, i quali si colorano sempre intensamente.

Nelle colture del *Saccharomyces lithogenes* non si verifica mai produzione di filamenti o ifi da una cellula rotonda. Invece, come vedremo in seguito, spesso nell'organismo da una cellula rotonda parte un filamento o ifo, il quale spesso presenta dei rigonfiamenti. Queste forme le ritengo per abortive, perchè non le ho potute mai osservare nelle migliori condizioni di sviluppo del parassita nei diversi terreni di nutrizione solidi e liquidi.

Interessante è certamente il fatto che tutti i blastomiceti patogeni

recentemente conosciuti e ben descritti nelle loro proprietà colturali appartengono al medesimo gruppo.

III.

Le cavie, che al numero di dieci furono inoculate nel connettivo sottocutaneo con una emulsione in brodo sterile delle glandole del bue, che mi furono mandate in esame, morirono in media dopo due mesi, presentando il seguente reperto anatomo-patologico: nel sito d'inoculazione si nota la presenza di un tumore oscillante tra la grandezza di un pisello e quella di una nocciuola, pastoso al tatto, poco aderente alla cute; le glandole linfatiche inguinali ed ascellari, specialmente in vicinanza del sito d'inoculazione, sono considerevolmente ingrossate. Aperta la cavità addominale si osservano qualche volta dei piccoli noduli nel grande epiploon. La milza poco ingrandita presenta alla superficie delle chiazze piccole, più o meno numerose, di colorito bianco sporco, poco sporgenti. Nei reni raramente si vedono le piccole chiazze innanzi descritte. Le glandole mesenteriali sono alquanto ingrossate.

Il fegato e l'intestino sono di apparenza normali. Nella cavità toracica i polmoni sono alquanto ingrossati ed aumentati di consistenza, quasi epatizzati, e spesso sulla superficie mostrano delle piccole chiazze di colore bianco sporco. Nessuna alterazione macroscopica nel cervello e nel cervelletto.

Per le inoculazioni del blastomicete patogeno nelle cavie ho usato o le colture per strisciamento su agar, ovvero le colture su patate, per non inoculare contemporaneamente ai parassiti i loro prodotti solubili, che mi propongo di studiare in seguito. Adoperando le colture su agar, aggiungevo a queste, nel momento della inoculazione, dell'acqua sterilizzata, nella quale, con l'agitazione, molto facilmente si emulsionano le cellule blastomicetiche. Adoperando invece le colture su patate, raschiavo la patina della coltura con una spatola di platino sterilizzata e poi la stemperavo nell'acqua sterilizzata.

Le colture fatte nei diversi terreni di nutrizione solidi si sono mostrate ugualmente virulente, ed ugualmente virulente si sono dimostrate tanto le colture vecchie conservate in laboratorio per parecchi mesi alla temperatura dell'ambiente, quanto le colture giovani di pochi giorni.

Mentre le cavie, che sono state inoculate con colture pure nel connettivo sottocutaneo, sono morte in media dopo due mesi, le cavie ino-

culate nella cavità addominale sono morte in media dopo un mese. Il reperto anatomo-patologico tanto delle une quanto delle altre non presentava grandi differenze ed era perfettamente identico a quello innanzi descritto.

Alquanto diverso è stato il reperto anatomo-patologico delle cavie inoculate direttamente nel fegato, che in media sono morte anche dopo un mese. In queste cavie la massima lesione si è trovata nel fegato, il quale presentava, là ove era avvenuta la inoculazione, una massa di tessuto neoformato, di colore bianco-gialliccio e diversi noduli intorno a questa massa di tessuto, alquanto sporgenti sulla superficie. Al taglio questa massa di tessuto neoformato consistente occupava quasi tutta la spessezza dell'organo. Scarse erano le lesioni che si osservavano macroscopicamente negli altri organi.

Molto interessante è l'esame a fresco dei parassiti presi direttamente dai tessuti ed osservati senza l'aggiunta di liquidi fissatori. Dissociando con gli aghi piccoli pezzi di glandole linfatiche di cavie morte in seguito ad inoculazione di colture pure di *Saccharomyces lithogenes* si vedono molti parassiti allo stato libero ed altri in discreto numero nei corpi cellulari degli elementi linfatici. Dei parassiti allo stato libero alcuni presentano la sola membrana rifrangente meno spessa negli elementi più piccoli, più spessa in quelli più grandi, altri presentano anche un alone ialino, vario per spessezza, che circonda la membrana rifrangente. Il contenuto per lo più è formato da un protoplasma omogeneo nel quale vi sono granuli rifrangenti vari per numero e grandezza. Accanto a queste forme di aspetto normale ve ne sono delle altre che rifrangono fortemente la luce, alla stessa guisa del vetro, e fanno l'impressione come se fossero dovute ad un ispessimento contemporaneo della membrana rifrangente e del granulo rifrangente centrale, in modo che questi blastomiceti presentano un anello fortemente rifrangente, che circonda una massa rotonda ugualmente rifrangente. Altre volte sono colpite da questa degenerazione cellule blastomicetiche, che si trovano in gemmazione, ancora tra di loro unite, ed allora hanno origine quelle masse diversamente conformate (fig. 4, Tav. II) nelle quali la disposizione concentrica degli elementi insieme riuniti ricorda molto chiaramente il modo come si è formata. Queste masse di più blastomiceti degenerati sono piuttosto scarse nelle glandole linfatiche, nella milza, nel fegato, nei polmoni, nel cervello, ma sono numerosissime nei reni, nei quali accanto a queste masse in cui ancora si distinguono le cellule blastomicetiche che le hanno originate, ve ne sono delle altre nelle quali più non si distingue nulla degli elementi

che le hanno prodotte. Sono masse di forma irregolare, spesso con angoli sporgenti, spesso ridotte in un minuto *detritus*.

I blastomiceti che sono nello interno delle cellule linfatiche sono circondati da un alone ialino e contengono nel loro interno dei granuli rifrangenti. Ordinariamente sono incluse le cellule blastomicetiche più piccole. Sono inoltre non molto frequenti le cellule blastomicetiche, le quali lateralmente hanno un filamento invece di una piccola gemma. Se le masse calcaree costituite da blastomiceti degenerati si pongono, dopo averle bene isolate dal rene di una cavia, in goccia pendente di un substrato nutritivo e si fissano sotto al campo del microscopio, non si osserverà alcuno sviluppo di colonie. Lo stesso si verifica se si pongono nella goccia pendente le forme isolate che sono state colpite dalla degenerazione calcarea. Prendendo dei piccoli pezzi di rene di una cavia morta in seguito alla inoculazione di colture pure di *Saccharomyces lithogenes* e ponendoli in acqua sterilizzata per 24-48 ore, si vedranno dopo questo tempo tutte le forme parassitarie con una membrana ialina molto spessa (fig. 20, 21, 22, 23, Tav. I), e ciò non solamente nelle forme isolate, ma anche in quelle in via di moltiplicazione. La membrana ialina, che le cellule blastomicetiche presentano nei tessuti, è certamente un prodotto della membrana rifrangente (nelle figure è rappresentato in nero tutto ciò che alla osservazione microscopica appare rifrangente), e ciò è dimostrato dal fatto che nelle cellule in cui l'alone ialino è più spesso, è più sottile la membrana rifrangente. Interessante è osservare il modo come si comportano i blastomiceti presi dalle cavie, quando sono trattati con gli acidi o con gli alcali. Questo trattamento si fa molto bene dissociando prima in una goccia di acqua un pezzo di rene o di altro organo contenente molte forme parassitarie e poi facendo passare attraverso il preparato il reagente per mezzo di carta asciugante. Si possono così seguire al microscopio tutte le modificazioni che i blastomiceti presentano. Dirò prima delle modificazioni che presentano le forme normali e poi quelle degenerate. Se le forme normali si trattano con acido solforico, nitrico o cloridrico, dapprima presentano l'alone ialino un po' meno spesso che non sia quello osservato nelle forme tenute per molte ore in acqua (fig. 18, 19, Tav. I). Durando a lungo l'azione di questi acidi la membrana rifrangente si assottiglia di molto perdendo la rifrangenza, il contenuto protoplasmatico viene quasi completamente distrutto, tanto che la maggior parte dei blastomiceti si presentano ripiegati su sè stessi per introflessione della membrana rifrangente, che è molto più resistente del resto all'azione degli acidi. Azione più energica hanno gli acidi nitrico e solforico, meno ener-

gica l'acido cloridrico. Trattati con soluzioni concentrate di alcali i blastomiceti normali non presentano alcuna modificazione anche dopo molte ore.

Di maggiore interesse era certamente il modo di comportarsi verso i reagenti dei blastomiceti degenerati, perchè era necessario conoscere la natura chimica della sostanza che depositandosi in essi ne produceva la morte. Il trattamento con le sostanze chimiche dei blastomiceti degenerati è stato fatto con lo stesso metodo innanzi esposto.

Se le masse di blastomiceti degenerati si trattano con acido solforico, si sciolgono e subito dopo compaiono nel posto lasciato vuoto dalla massa calcarea dei cristalli aghiformi disposti a raggi intorno ad un centro comune, simili del tutto a quelli di solfato di calcio. Trattate con acido nitrico e cloridrico le masse calcaree scompaiono senza dar luogo ad effervescenza; si sciolgono anche se sono trattate con acido acetico. Le soluzioni concentrate di alcali lasciano immutate le masse calcaree anche dopo l'azione di molte ore.

Escluso che le masse calcaree fossero di carbonato di calcio, perchè non si erano sciolte con effervescenza negli acidi, bisognava vedere se si trattava di ossalato o fosfato di calcio. Sapendo che l'ossalato di calcio è insolubile nelle soluzioni calde e concentrate dei cloruri di potassio, sodio, ammonio, bario, stronzio e calcio, ma solubile notevolmente nelle soluzioni ugualmente calde dei sali appartenenti al gruppo magnesiaco, ho applicato queste reazioni alle masse calcaree ed ho veduto che non si sciolgono nei sali di magnesio a caldo, e quindi non si tratta di ossalato di calcio, ma di fosfato di calcio. Alla stessa conclusione sono venuto facendo le stesse reazioni sulle masse calcaree delle glandole linfatiche del bue, che erano già indurite in alcool.

Nella descrizione delle sezioni degli organi dirò dettagliatamente del modo come s'inizia questa degenerazione nelle singole cellule blastomicetiche e come hanno origine le masse calcaree grandi innanzi descritte. Qui mi piace solo far notare che questo deposito di fosfato di calce intorno alle forme parassitarie avviene esclusivamente nell'organismo vivente. Infatti coltivando su pezzi di organi di cavia, raccolti in modo sterile in capsule di Petri, il *Saccharomyces lithogenes* si sviluppa molto rigogliosamente, ma non si osservano mai quei processi di degenerazione, che hanno luogo nell'organismo vivente delle cavie.

Gli organi delle cavie destinati alla ricerca istologica furono in parte induriti in liquido di Müller, che dà sempre ottimi risultati,

in parte in alcool assoluto, il quale presenta lo svantaggio di raggrinzare non poco le forme parassitarie. Piccoli pezzi degli organi, così fissati ed induriti, furono colorati *in toto* in litiocarminio ed i parassiti furono colorati nelle sezioni attaccate su vetrini portaoggetti con albumina con i metodi di colorazione da me esposti nei lavori precedenti. Con questi metodi di colorazione il *Saccharomyces lithogenes* si colora molto facilmente.

Abbiamo quindi due blastomiceti patogeni che sono perfettamente identici, tanto per le proprietà culturali, quanto per il modo di comportarsi verso le soluzioni coloranti, e si distinguono solamente per il fatto che il blastomicete che forma argomento di questa memoria dà nei tessuti delle forme degenerative, che non si osservano nei tessuti delle cavie morte in seguito ad inoculazione di *Saccharomyces neoformans.*

I tumori nel sito d'inoculazione delle cavie morte in seguito ad inoculazione di colture pure nel connettivo sottocutaneo presentano un reticolo di connettivo giovane nelle cui maglie vi sono abbondanti elementi cellulari, i più con nucleo rotondo intensamente colorato e corpo cellulare piccolo, pochi con nucleo grande spinto alla periferia del corpo cellulare e simili a corpuscoli linfatici. La struttura di questi tumori non si può assolutamente paragonare neanche da lontano a quella che si osserva in alcuni tumori dell'uomo e dei mammiferi superiori. E fa veramente grandissima meraviglia il leggere nel lavoro di Corselli e Frisco innanzi citato che nelle cavie inoculate con coltura del blastomicete isolato da un sarcoma dell'uomo abbiano osservato tumori, che presentavano la stessa struttura istologica del sarcoma.

Le forme parassitarie non sono così numerose, come nei tumori locali delle cavie inoculate con il *Saccharomyces neoformans.*

I blastomiceti sono intensamente colorati ed i più piccoli (fig. 4, Tav. I), presentano una sottilissima membrana intensamente colorata ed un contenuto fatto da due sostanze, l'una più debolmente colorata, omogenea, l'altra più intensamente colorata e granulosa; i più grandi poi o presentano le due membrane (fig. 5, 6, 7, 8, 9, 10, Tav. I), la interna rifrangente intensamente colorata e la esterna ialina incolora, con contenuto costituito dalle due sostanze diversamente colorate, ovvero presentano (fig. 13, 14, Tav. I) una capsula ialina ed un contenuto intensamente colorato ed affatto omogeneo. Sono queste ultime forme quelle che più somigliano ai corpuscoli a fucsina descritti dal Russell. Altri parassiti (fig. 11, 12, Tav. I) fanno vedere le due membrane e nell'interno presentano sul fondo,

omogeneo e debolmente colorato, scarso contenuto cromatico. Finalmente se ne vedono molti con contenuto debolissimamente colorato e senza granuli, che sono in via di degenerazione, perchè nella membrana ialina già vi è un accenno di spiccata rifrangenza, dovuta al deposito di fosfato di calcio. È un fatto bene accertato che la degenerazione calcarea comincia dalla membrana ialina, e però si spiega come, impedito lo scambio dei succhi nutritivi, il contenuto cromatico sia scarso. Nelle glandole linfatiche le masse grandi dovute a degenerazione di blastomiceti, che non si colorano mai, sono scarse. Il midollo delle ossa lunghe è molto ricco di elementi linfoidi e sono quasi del tutto scomparse le zolle adipose. Accumuli di elementi linfoidi si osservano specialmente intorno alle forme parassitarie, che sono in numero scarso.

Anche nella milza è aumentato il numero degli elementi linfoidi tanto nei follicoli, quanto negli spazi interfollicolari. Si osserva un discreto numero di blastomiceti situati e nei follicoli e negli spazi interfollicolari. Tanto nel midollo delle ossa lunghe, quanto nella milza sono piuttosto scarse le masse di blastomiceti in degenerazione calcarea. Nessuna alterazione ho notata nel fegato delle cavie inoculate, sia nel connettivo sottocutaneo, sia nella cavità addominale. Scarsi sono i blastomiceti che si osservano nella mucosa intestinale e nel pancreas. Nei reni si trovano lesioni più importanti, maggior numero di parassiti e molte masse calcaree. I parassiti normali ben colorati si trovano a preferenza nella sostanza corticale. Qua e là si vedono dei noduli costituiti da elementi cellulari, forse di origine connettivale, in mezzo ai quali vi sono molte forme parassitarie, che presentano la struttura poco prima descritta. Rari sono i canalini renali, che contengono nel loro lume blastomiceti. I noduli che si osservano nella sostanza corticale non presentano i caratteri di noduli d'infiammazione, non presentando i nuclei degli elementi, che li costituiscono, i caratteri dei leucociti extra-vasali. Spesso nelle anse glomerulari si vedono delle forme parassitarie, ciò che ci spiega come esse pervengono nel rene. Facilmente dopo rottura delle anse glomerulari e della capsula del Bowmann i parassiti passano nel connettivo interstiziale, dove, degenerando, presentano quelle masse calcaree, di cui ho già parlato innanzi. In alcune di queste masse calcaree (fig. 2, Tav. I; fig. 3, Tav. II) si vede chiaramente che provengono dalla degenerazione di più cellule blastomicetiche, mentre in altre questa provenienza non appare così evidente (fig. 4, Tav. II), e solamente la disposizione delle piccole masse degenerate, a strati concentrici, ricorda un po' le cellule blastomicetiche. Finalmente in altre

masse (fig. 2, Tav. II) non si può più nulla distinguere delle cellule blastomicetiche che le hanno prodotte.

La formazione delle grandi masse calcaree si spiega facilmente pensando che il deposito di fosfato di calcio sia avvenuto intorno a più cellule in via di gemmazione, ovvero pensando che il fosfato di calcio depositandosi sulle pareti di più cellule blastomicetiche, poste le une accanto alle altre, le abbia tutte comprese. In alcune di queste masse calcaree (fig. 2, Tav. II) si vedono degli spazi, che al microscopio appaiono neri e che nelle figure sono rappresentati in bianco. Questi spazi sono pieni di aria e rappresentano le parti centrali o gli aloni periferici non ancora occupati dalla sostanza calcarea, ciò che si spiega facilmente riflettendo che il deposito di fosfato di calcio ha luogo nello stesso tempo sulla membrana ialina e in uno o più granuli rifrangenti, che stanno al centro delle cellule blastomicetiche. A questo modo si spiegano le forme svariate che possono assumere le masse calcaree. Intorno a queste masse la reazione da parte del tessuto è molto scarsa, ciò che s'intende facilmente con la rapidità con cui i parassiti sono andati incontro alla degenerazione.

Nessuna alterazione si osserva nell'epitelio renale, tanto dei tubuli contorti, quanto di quelli retti. Le masse calcaree sono più numerose nella sostanza midollare che nella sostanza corticale e sono per lo più disposte con il loro asse maggiore parallelo alla direzione dei tubuli retti. Come in tutti gli altri organi, queste masse calcaree non si colorano con il violetto di genziana.

Dopo il rene, il polmone è l'organo che presenta lesioni più importanti, perchè tanto al di sotto della pleura, quanto nella spessezza del parenchima si osservano numerosi noduli costituiti in massima parte dagli elementi del connettivo interstiziale proliferato, in mezzo ai quali si trovano numerose cellule a nucleo intensamente colorato. Per la proliferazione degli elementi del connettivo avviene quasi una totale scomparsa degli alveoli ed in alcuni di questi non ancora del tutto scomparsi si veggono cellule in gran parte necrotizzate, qualche volta fuse insieme in modo da costituire cellule giganti (fig. 3, Tav. I), e provenienti dalle pareti degli alveoli stessi. In mezzo a questi gruppi di elementi necrotizzati si vedono dei granuli di pigmento ematico liberi o inclusi nelle cellule. Le forme parassitarie ben colorate si trovano nel connettivo interstiziale ed intorno ad esse per lo più sono più numerosi gli elementi del tessuto. Nei vasi sanguigni non ho osservato blastomiceti. Nel polmone ordinariamente sono molto scarse le forme di blastomiceti isolati con degenerazione calcarea, come pure sono molto scarse le masse calcaree.

Anche nel cervello vi sono forme parassitarie in discreto numero, per lo più nella sostanza cerebrale corticale, dove si trovano in mezzo ad elementi cellulari con nucleo intensamente colorato e con corpo protoplasmatico piuttosto piccolo. Scarsi blastomiceti si trovano qualche volta nei vasi linfatici della sostanza cerebrale e numerosissimi sono poi nella tela coroidea. Nella sostanza cerebrale non ho veduto mai masse calcaree provenienti dalla degenerazione dei blastomiceti.

Costantemente ho notato che nelle cavie morte dopo un numero di giorni maggiore, il numero dei blastomiceti contenuto nei tessuti era minore e più considerevole la reazione da parte dei tessuti. In questo modo si spiega agevolmente perchè nei tessuti delle cavie, morte in seguito ad inoculazione nell'addome di colture pure di *Saccharomyces lithogenes,* ho riscontrato maggior numero di parassiti e lesioni meno considerevoli da parte dei tessuti, che non nelle cavie morte per inoculazione sottocutanea. Anche la degenerazione calcarea dei parassiti è minore nelle prime, maggiore nelle seconde.

Il tessuto neoformato nel fegato delle cavie inoculato in questo organo con colture pure di *Saccharomyces lithogenes* è costituito da uno stroma connettivale, in cui sono comprese molte cellule giganti a nucleo debolmente colorato e cellule mononucleate, di cui alcune ricordano l'aspetto delle cellule epatiche, altre quello dei corpuscoli linfatici (fig. 5, Tav. II). In alcuni punti dello stroma connettivale si osservano molti dotti biliari neoformati. In mezzo al tessuto neoformato si vedono, dove isolate, dove aggruppate, delle masse calcaree, alcune delle quali ricordano la forma degli elementi da cui sono originate, altre non la ricordano punto. Scarsissime forme parassitarie ben colorate si vedono tra gli elementi di neoformazione. Negli altri organi di queste cavie non si osservano lesioni d'importanza e le forme parassitarie sono ordinariamente molto scarse.

In conclusione il *Saccharomyces lithogenes* nelle cavie dà luogo ad una infezione generale diffondendosi in tutti gli organi, a preferenza per mezzo dei vasi linfatici, dai quali passa ordinariamente nella corrente sanguigna e perviene nei reni, nei quali degenerando produce un numero maggiore di masse calcaree che non negli altri organi.

Il *Saccharomyces lithogenes* è patogeno anche per i topi bianchi, che inoculati nel connettivo sottocutaneo muoiono in media dopo otto giorni con una infezione diffusa e con lesioni da parte degli organi meno appariscenti che non nelle cavie. Al reperto anatomo-patologico si trovano le glandole inguinali ed ascellari alquanto ingrossate; la milza aumentata di volume e con chiazze puntiformi alla superficie, di colorito grigiastro; nei reni e nel fegato non si osserva alcuna le-

sione; le glandole linfatiche mesenteriali sono ingrossate; nel granae epiploon vi sono piccoli nodulini di colorito bianchiccio. Nei polmoni e nel cervello non si osserva nulla di anormale.

L'esame microscopico a fresco di uno qualunque dei tessuti dimostra numerosissime forme parassitarie di grandezza molto varia, alcune libere normali ed in via di degenerazione calcarea, altre incluse nel corpo cellulare dei leucociti (fig. 24 a 42, Tav. I). Di forme normali ve ne sono con sola membrana rifrangente e con doppia membrana, la interna rifrangente e la esterna ialina. In alcune forme (fig. 32, Tav. I) si nota una membrana ialina molto spessa. Quanto al contenuto di queste forme si osservano le stesse particolarità di struttura notate a proposito delle cavie. Non poche sono le forme in via di degenerazione (fig. 35, 36, 38, 39, 40, Tav. I) nelle quali si vede molto chiaramente come il deposito di fosfato di calcio comincia dalla periferia. In alcune forme questo deposito avviene contemporaneamente su tutta la periferia, in modo che si forma uno spesso anello rifrangente, che poi spesso si rompe in segmenti (fig. 40, Tav. I); in altre avviene disugualmente in modo da avere delle semilune rifrangenti (fig. 38, Tav. I) Le forme incluse nei leucociti (fig. 41-42, Tav. I) presentano le stesse particolarità notate per le cavie. Nei preparati a fresco fatti da tutti gli organi dei topolini non ho mai osservato masse calcaree come quelle descritte nelle cavie ciò che si spiega con la rapidità con cui avviene la morte in questi, animali.

Le lesioni che presentano le sezioni degli organi, trattate con lo stesso metodo di colorazione esposto innanzi, sono minime e la diffusione dei parassiti molto considerevole, tanto che non si trovano solamente in tutti gli spazi linfatici, ma anche nei vasi sanguigni. Nella milza si osservano gruppi di parassiti nei follicoli e negli spazi interfollicolari; nel rene si vedono noduli nella sostanza corticale; nel fegato (fig. 1, Tav. II), tutti i capillari si vedono ripieni di parassiti; nel polmone vi sono qua e là dei gruppi di parassiti intorno ai quali sono molti elementi del tessuto; nel cervello si vedono gruppi di parassiti nella sostanza corticale. Nei vasi sanguigni ordinariamente i blastomiceti presentano un alone ialino molto spesso, mentre quelli che sono nei vasi linfatici o non ne presentano, o ne presentano uno di spessore minore. Questa proprietà, che hanno i blastomiceti di circondarsi di alone ialino o capsula che voglia chiamarsi, è comune ad alcuni schizomiceti patogeni, come ad esempio il diplococco della polmonite ed il bacillo del carbonchio.

Interessante è la differenza nell'azione patogena che il *Saccharomyces lithogenes* esercita nell'organismo della cavia e nell'organismo

del topo bianco. Mentre nella prima si ha una diffusione dei parassiti nei vasi linfatici e solo eccezionalmente nei vasi sanguigni con localizzazioni nei diversi organi, nel topo vediamo una diffusione ugualmente abbondante nei vasi linfatici e sanguigni senza speciali localizzazioni. Ciò indubbiamente è da spiegare con la maggiore suscettibilità del topo alla infezione blastomicetica e con la minore durata della infezione. È legge costante per le infezioni che quanto più un agente patogeno esercita la sua azione su di un organismo, tanto più si diffonde in esso, tanto meno dura la infezione e tanto minori sono le lesioni da parte dei tessuti.

Dirò ora dei risultati ottenuti dalla inoculazione delle colture pure di *Saccharomyces lithogenes* nelle pecore, importanti non per le lesioni, che finora hanno prodotto, ma per la rapidità con cui le forme parassitarie hanno presentato forme degenerative.

Amendue le pecore furono inoculate nel connettivo sottocutaneo della regione interna delle cosce. Dopo alcuni giorni si formò una piccola tumefazione nel sito d'inoculazione, che raggiunse la grandezza di una piccola nocciuola nei giorni successivi. Questa tumefazione in una delle pecore si ulcerò al sedicesimo giorno e nell'altra al ventesimo, e venne fuori una sostanza cremosa, giallastra, come pus, che esaminata al microscopio fece vedere pochissime forme di parassiti normali, moltissimi in degenerazione calcarea, cellule giganti e leucociti senza l'apparenza dei corpuscoli di pus, alcuni dei quali avevano incluso forme parassitarie giovani. Questa osservazione fu fatta alla metà dello scorso giugno. Gli animali guarirono del tutto e fin'oggi non hanno presentato alcun segno di altra malattia. Fo notare che amendue le pecore erano molto giovani.

Le forme parassitarie normali erano del tutto simili a quelle innanzi descritte (fig. 6, 7, 8, Tav. II). Interessanti molto erano invece le forme degenerate, specialmente per il fatto che erano state colpite dalla degenerazione calcarea le forme in gemmazione normali e quelle aberranti, che presentavano ifi (fig. 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, Tav. II). Si vedevano anche masse calcaree provenienti dalla degenerazione di più blastomiceti in gemmazione (fig. 15, Tav. II). Dirò in altro lavoro dei risultati ottenuti dalle inoculazioni in altre pecore. Per ora mi piace di far notare che la coltura pura di un blastomicete patogeno isolato da un bue morto con carcinoma primitivo del fegato, inoculato a due pecore non ha dato luogo a produzione di tumore, sibbene ad una sostanza cremosa di colore gialliccio, che secondo me non merita il nome di pus, perchè non mostra i caratteristici corpuscoli di pus con nuclei frammentati e perchè contiene cellule giganti.

Questi risultati ottenuti nelle due pecore non devono far meraviglia, perchè non è detto che un blastomicete isolato da un tumore di un animale inoculato ad un animale di altra specie debba produrre lo stesso tumore e poi perchè prima di dire che il *Saccharomyces lithogenes* nelle pecore non produce tumori, bisogna inocularne molte e di età avanzata. Son sicuro che molti blastomiceti s'isoleranno da tumori maligni dell'uomo, che inoculati negli animali suscettibili a contrarre tumori maligni non produrranno nulla. Non bisogna dimenticarsi che si ha a che fare con parassiti, che essendo stati molto tempo nell'organismo, vi si sono molto adattati, e che inoltre bisogna trovare, perchè la inoculazione dia risultato positivo, un animale suscettibile o predisposto. Di ciò tratterò nella terza memoria, nella quale dirò delle inoculazioni del *Saccharomyces neoformans* nei cani ed in altri animali. Per ora tenendoci ai risultati esposti in questa memoria intorno all'azione patogena del *Saccharomyces lithogenes,* noi possiamo dire di conoscere oggi un blastomicete patogeno, il quale nei tessuti degenera sotto la forma di masse calcaree. La importanza di questo fatto non sfuggirà ad alcuno, quando si pensa alla frequenza con cui avvengono le calcificazioni nei tumori, specialmente degli erbivori, e che prima delle ricerche esposte in questa memoria non si sarebbero certo attribuite a degenerazioni dei blastomiceti.

Non è quindi tanto importante lo studiare il modo come i blastomiceti si presentano normalmente nei tessuti quanto il seguire il modo con cui degenerano, potendosi facilmente confondere i processi degenerativi dei blastomiceti con quelli del tessuto nel quale essi si trovano. Da ciò si argomenti quanto sia falso l'indirizzo di quei ricercatori, i quali vogliono attribuire le forme descritte come parassiti del cancro solamente a processi degenerativi degli elementi cellulari del tessuto, fondandosi su ricerche a base istologica.

Cagliari, 25 novembre 1895.

Spiegazione delle Tavole.

Tavola I.

Fig. 1. Sezione di glandola linfatica di bue morto in seguito a carcinoma primitivo del fegato. Blastomiceti in degenerazione calcarea. (Tutti i blastomiceti in degenerazione calcarea essendo rifrangenti come il vetro, sono figurati in nero). Oc. 2. Ob. $^1/_{12}$ immersione. Koristka.

Fig. 2. Sezione di rene di cavia morta in seguito ad inoculazione nell'addome di coltura pura di *Sacch. lithogenes*. Tra i canalini si vede una massa calcarea originata da più blastomiceti. Oc. 2. Ob. $^1/_{12}$. Koristka.

Fig. 3. Sezione di polmone di cavia morta in seguito ad inoculazione nell'addome di coltura pura di *Sacch. lithogenes*. Nodulo costituito da elementi fissi. Blastomiceti non degenerati. Oc. 1. Ob. 6. Koristka.

Fig. 4. Forma parassitaria giovane, senza alone ialino. Da cavia. Oc. 3. Ob. $^1/_{12}$. Koristka.

Fig. 5 a 10. Forme parassitarie con ricco contenuto cromatico con alone ialino. Idem, idem.

Fig. 11 e 12. Forme parassitarie con doppia capsula, la interna rifrangente, intensamente colorata, la esterna ialina, incolora, con scarso contenuto cromatico. Idem, idem.

Fig. 13 e 14. Forme parassitarie con contenuto cromatico omogeneo ed intensamente colorato. Idem, idem.

Fig. 15 e 16. Forme parassitarie in via di degenerazione con doppia capsula e con contenuto protoplasmatico omogeneo e debolmente colorato. Idem, idem.

Fig. 17. Forma parassitaria con doppia capsula, di cui la esterna ialina, costituita da due sostanze diversamente rifrangenti. Idem, idem.

Fig. 18 e 19. Forme parassitarie sottoposte all'azione di una soluzione forte di acido nitrico. La membrana esterna è molto ispessita. Idem, idem.

Fig. 20 a 23. Forme parassitarie, che hanno subìto per 24 ore l'azione dell'acqua. La membrana esterna ialina è fortemente rigonfiata. Idem, idem.

Fig. 24 a 29. Forme parassitarie giovani, osservate a fresco, senza aggiunta di liquido. Presentano la sola membrana interna rifrangente. Dal topo bianco. Idem.

Fig. 30. Forma parassitaria più grande con capsula rifrangente e con contenuto finamente granuloso. Idem, idem.

Fig. 31 e 32. Forme parassitarie con la membrana interna rifrangente e con la esterna ialina diversamente spessa. Idem, idem.

Fig. 33 a 35. Forme parassitarie con contenuto costituito da due sostanze diversamente rifrangenti e diversamente disposte. Idem, idem.

Fig. 36. Forma parassitaria giovane con forte ispessimento della membrana rifrangente. Idem, idem.

Fig. 37. Forma parassitaria con granuli rifrangenti alla periferia. Idem, idem.

Fig. 38 a 40. Forme parassitarie con ispessimento della membrana rifrangente. Parassiti in via di degenerazione. Idem, idem.

Fig. 41 e 42. Leucociti contenenti nei corpi cellulari forme parassitarie giovani. Idem, idem.

TAVOLA II.

Fig. 1. Sezione di fegato di topo bianco morto in seguito ad inoculazione nel connettivo sottocutaneo di coltura pura di *Saccharomyces lithogenes*. Oc. 3. Ob. 6. Koristka.

Fig. 2. Rene di cavia morta in seguito ad inoculazione sottocutanea di *Saccharomyces lithogenes*. Massa calcarea originata dalla degenerazione di più blastomiceti nel connettivo interstiziale. Oc. 2. Ob. $^1/_{12}$. Koristka.

Fig. 3. Rene di cavia morta in seguito ad inoculazione in addome di coltura pura di *Saccharomyces lithogenes*. Gruppo di blastomiceti degenerati nel connettivo interstiziale. Oc. 2. Ob. $^1/_{12}$. Koristka.

Fig. 4. Rene di cavia morta in seguito ad inoculazione in addome di coltura *Saccharomyces lithogenes*. Massa calcarea a strati concentrici originata da più blastomiceti. Oc. 4. Ob. $^1/_{12}$. Koristka.

Fig. 5. Fegato di cavia morta in seguito ad inoculazione nel fegato di coltura pura di *Sacch. litogenes*. Masse calcaree provenienti dalla degenerazione di più blastomiceti. Oc. 3. Ob. 4. Koristka.

Fig. 6 a 8. Forme parassitarie normali vedute a fresco e provenienti dal connettivo sottocutaneo di una pecora. Oc. 3. Ob. DD. Zeiss.

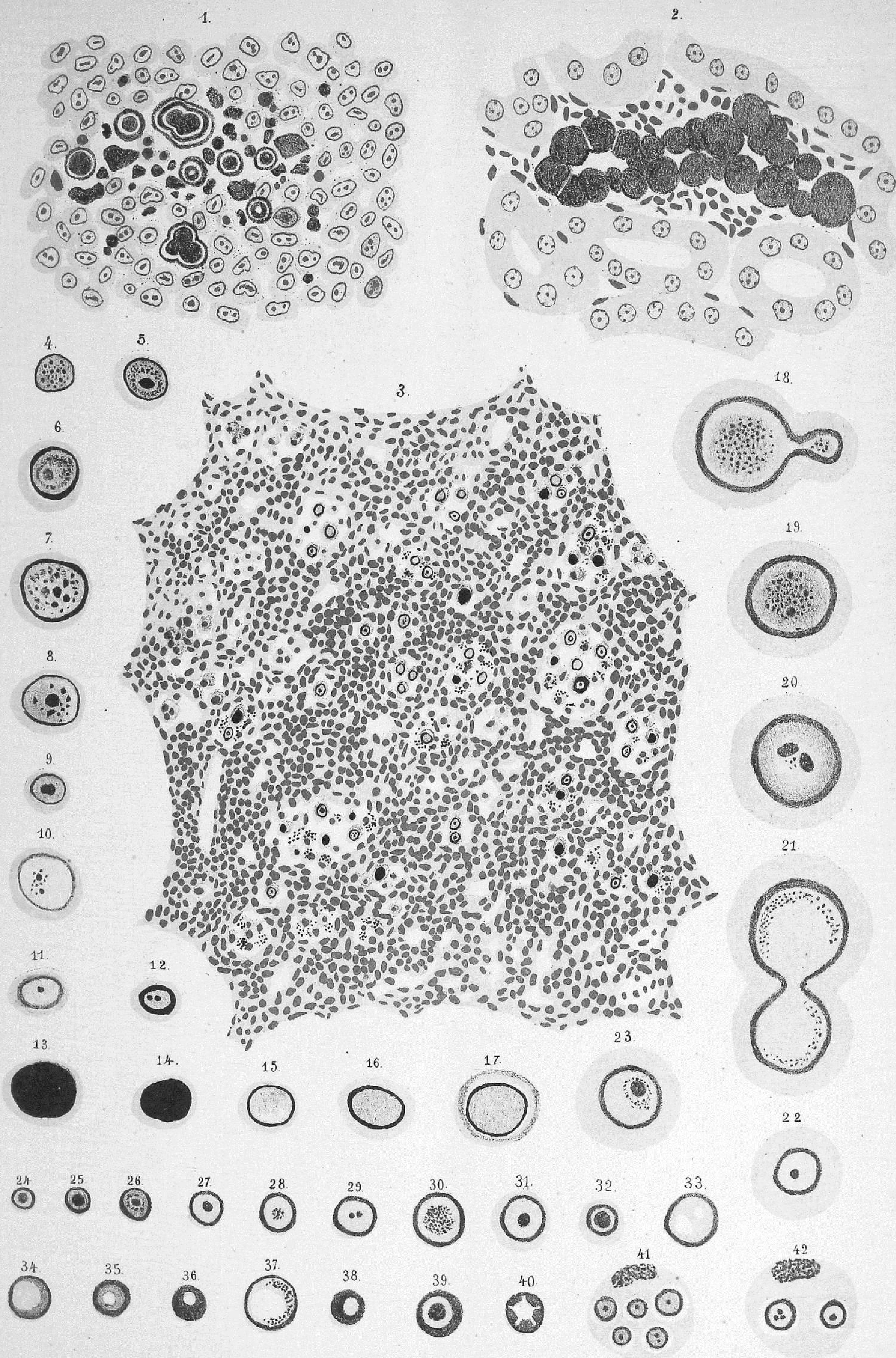
Fig. 9 e 10. Forme parassitarie con degenerazione calcarea. Idem, idem.

Fig. 11 a 14. Forme parassitarie in gemmazione colpite dalla degenerazione calcarea. Idem, idem.

Fig. 15. Gruppo di blastomiceti colpito dalla degenerazione calcarea. Idem, idem.

Fig. 16 a 18. Forme parassitarie gemmanti colpite da degenerazione calcarea. Idem, idem.

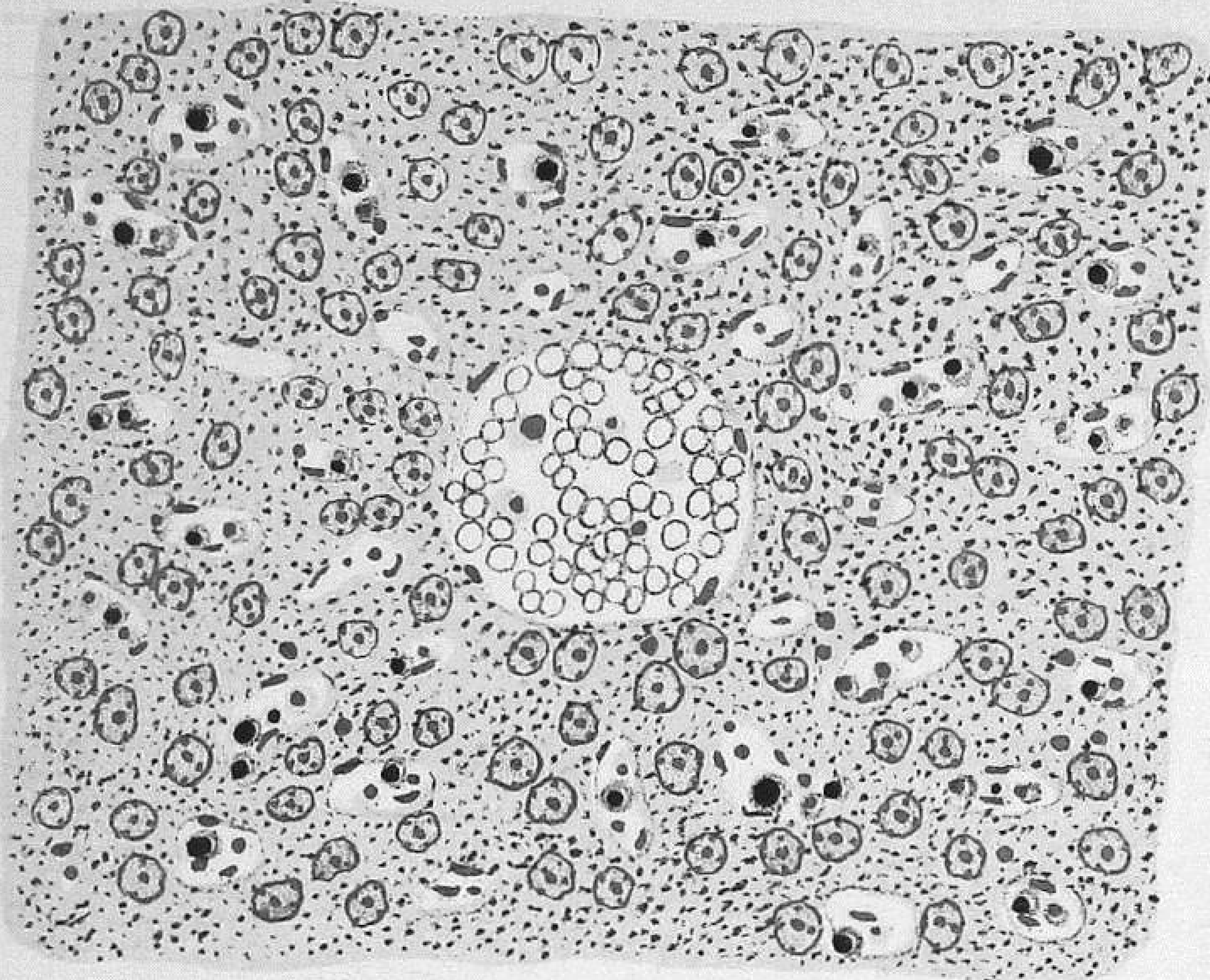
ROMA — TIP. DELL' UNIONE COOPERATIVA EDITRICE



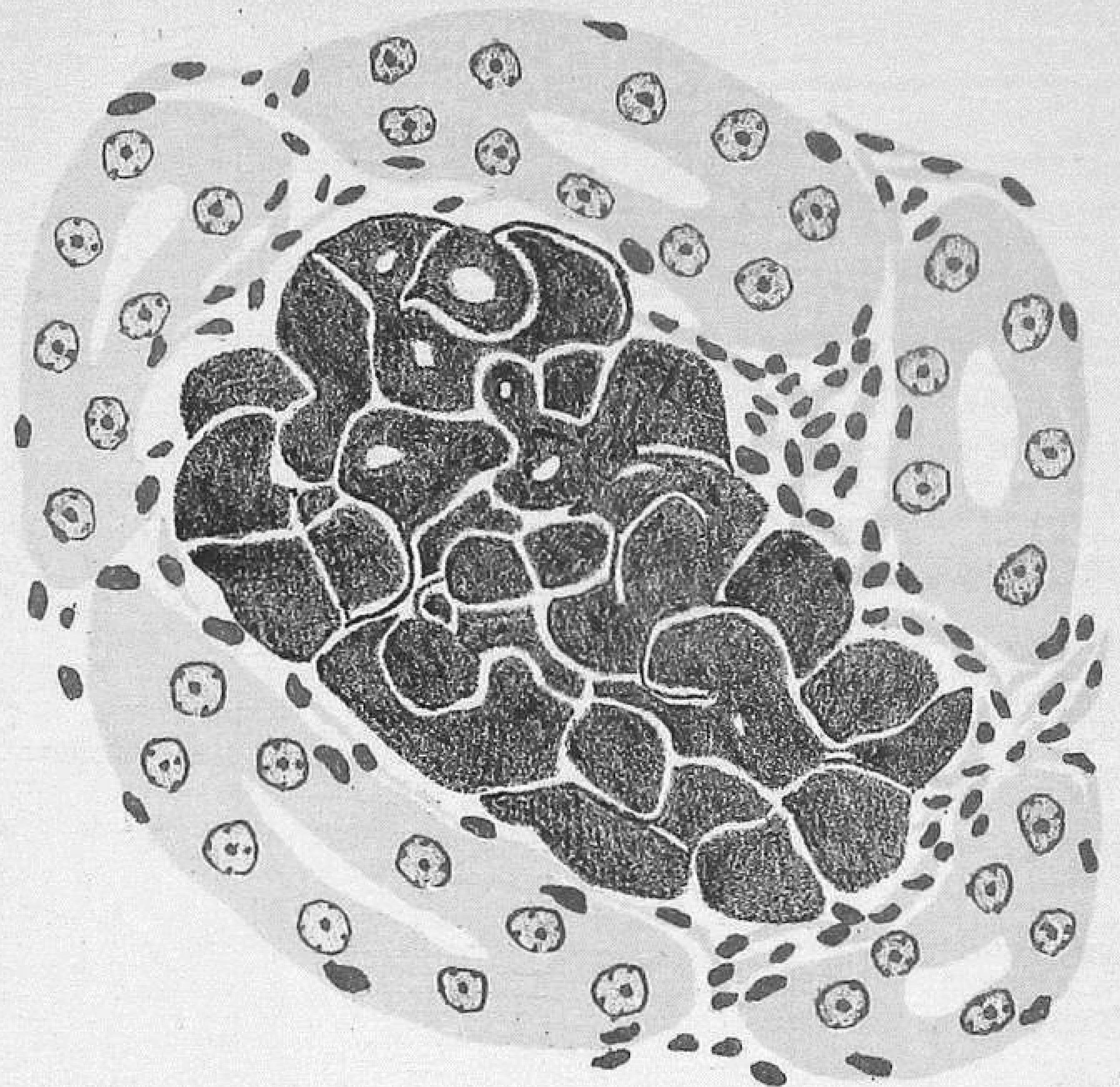
SANFELICE DIS.

E. BATTISTI LIT-ROMA

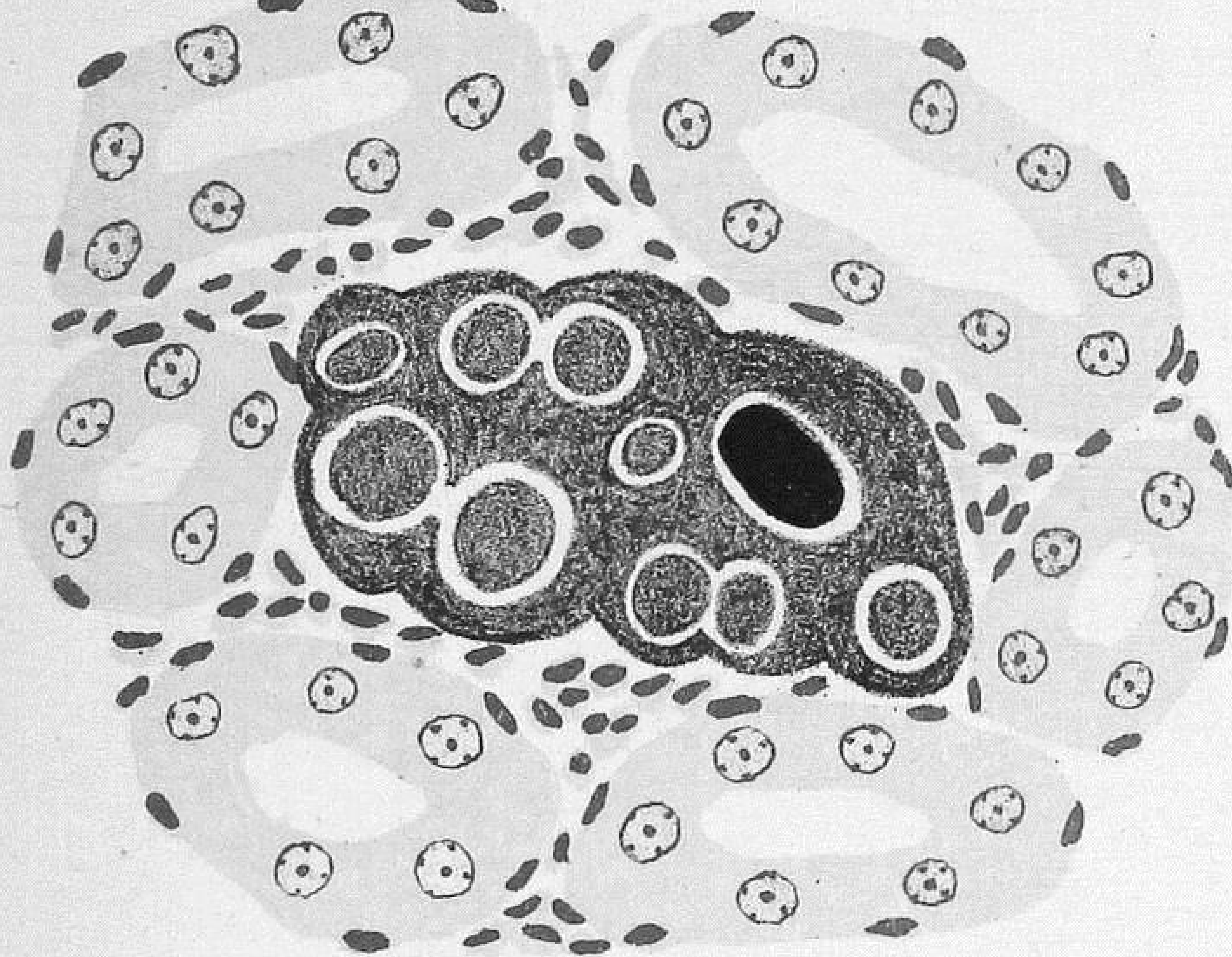
1.



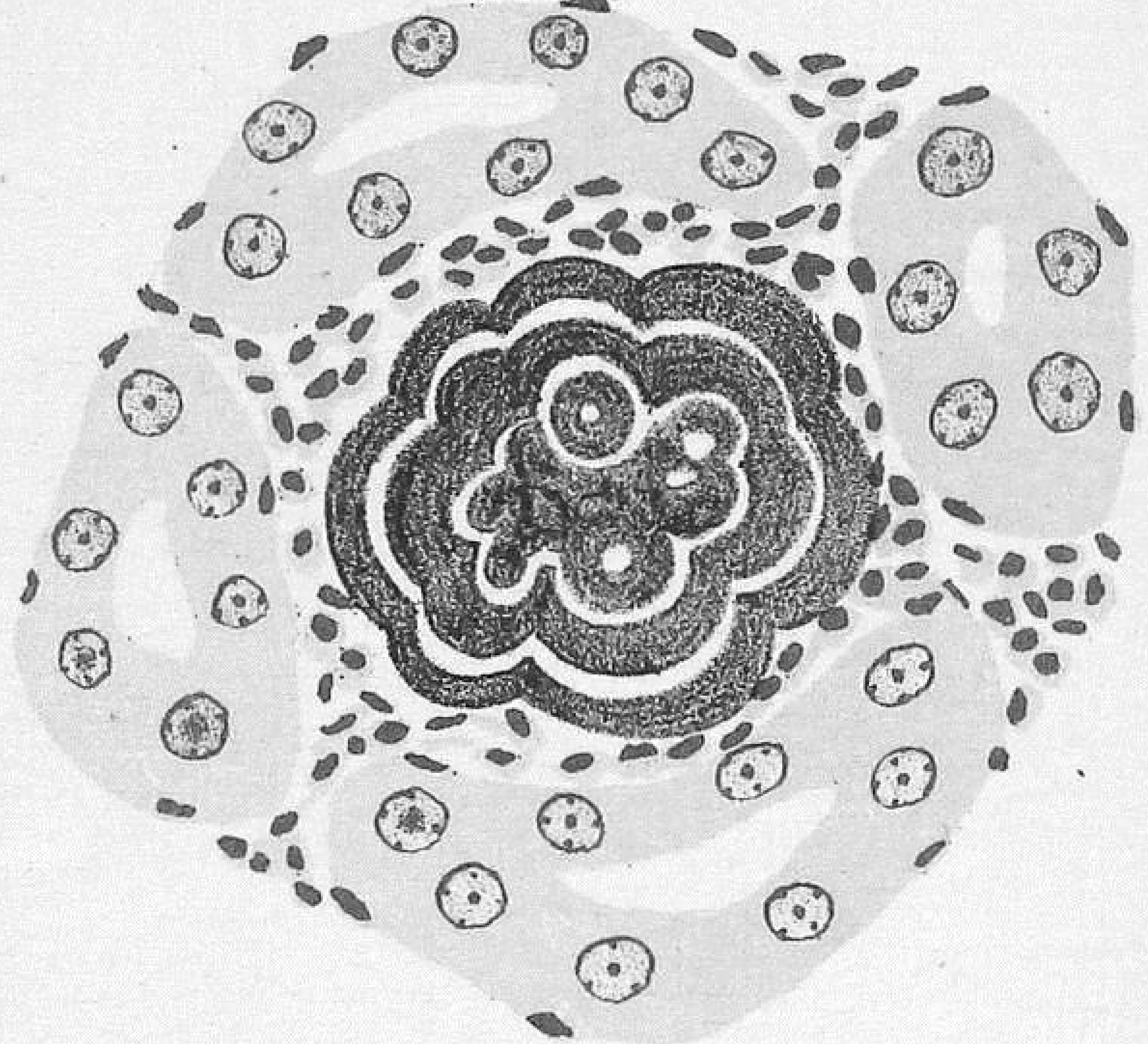
2.



3.



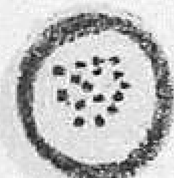
4



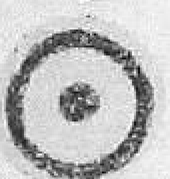
6.



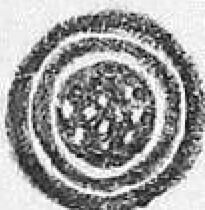
7.



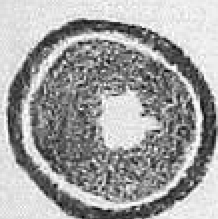
8.



9.



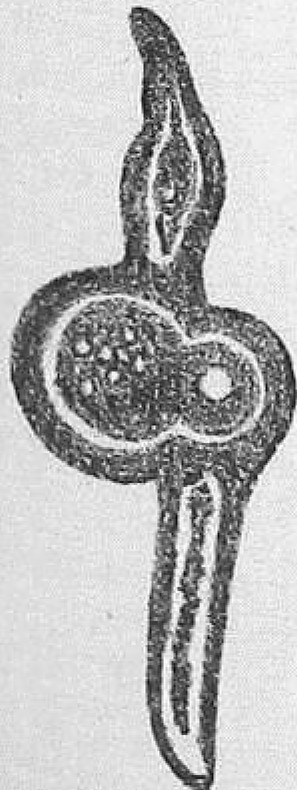
10.



11.



12.



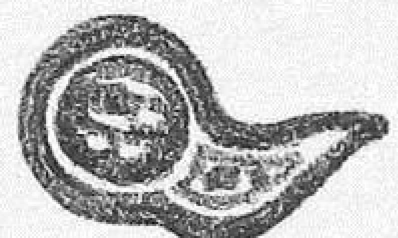
13.



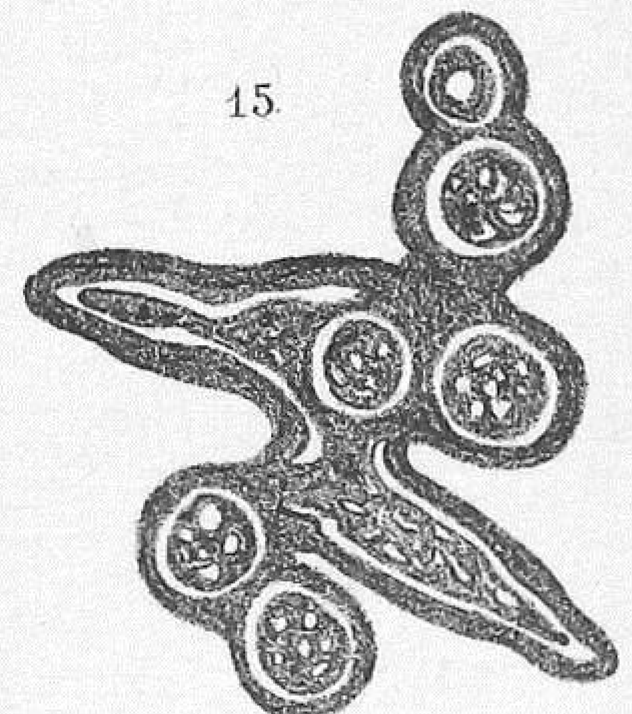
5.



14.



15.



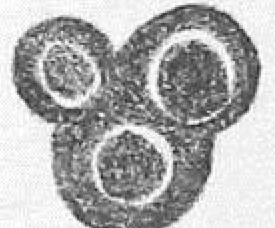
16.



17.



18.



SANFELICE DIS.

E. BATTISTI LIT-ROMA